

08-894356
PCT/JP96/00348

27.03.96

22/5

TIN

hol

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1995年 2月17日

REC'D 27 MAR 1996

出 願 番 号
Application Number:

平成 7年特許願第067159号

WIPO

PCT

出 願 人
Applicant (s):

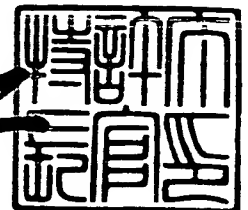
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1996年 5月24日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

清 川 佑 二



出証番号 出証特平08-3032481

【書類名】 特許願

【整理番号】 P95-0005

【提出日】 平成 7年 2月17日

【あて先】 特許庁長官 高島 章 殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 アシル基転移酵素をコードする遺伝子

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 芦刈 俊彦

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 田中 良和

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 藤原 裕之

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 中尾 正宏

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 福井 祐子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー

株式会社 基礎研究所内

【氏名】 米倉 圭子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 水谷 正子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
株式会社 基礎研究所内

【氏名】 久住 高章

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【郵便番号】 530

【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代表者】 鳥井 信一郎

【電話番号】 06-346-1131

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アシル基転移酵素をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子。

【請求項2】 配列表1において塩基配列番号21～1412の塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 配列表1においてアミノ酸配列番号5～468のアミノ酸配列を有する組換え芳香族アシル基転移酵素。

【請求項4】 植物体内における色素のアシル化方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化を行うことを特徴とする方法。

【請求項5】 色素がアントシアニンである請求項4記載の植物体内における色素のアシル化方法。

【請求項6】 植物体内における色素の安定化方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応が行われることにより当該色素が安定化されることを特徴とする方法。

【請求項7】 色素がアントシアニンである請求項6記載の植物体内における色素の安定化方法。

【請求項8】 植物の花色調節方法において、芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子を、導入する植物において適当な発現ベクターに組み込み、当該植物に導入後、当該植物体内において目的色素のアシル化反応によって当該色素が安定化されることにより植物の花色を目的の花色に調節することを特徴とする方法。

【請求項9】 色素がアントシアニンである請求項8記載の植物の花色調節方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) 由来の芳香族アシル基転移酵素をコードする cDNA 及びその利用に関するものである。

【0002】

【従来技術】

花産業は新規かつ種々の品種を開発することに努力している。新規な品種の育成のための有効な方法の一つとして花の色を変えることがあり、古典的な育種方法を用いて、ほとんどの商業的品種について広範囲な色を作出することに成功している。しかしながら、この方法では種ごとで遺伝子プールが制限されていることから、単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することは稀である。

【0003】

花の色は主として2つのタイプの色素、即ちフラボノイド及びカロチノイドに基づき、フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与し、カロチノイドはオレンジ又は黄色の色調に寄与する。花色に主たる寄与をするフラボノイド分子はシアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びペラルゴニジンの配糖体であるアントシアンであり、異なるアントシアンが顕著な花の色の変化をもたらす。さらに花の色は無色のフラボノイドの補助発色、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液胞の pH により影響される (Forkmann, Plant Breeding 106:1, 1991)。

【0004】

アシル化されたアントシアンは、シネラリア (*Senecio cruentus*) 由来のシネラリン (Goto et al., Tetrahedron 25:6021, 1984)、ツユクサ (*Commelina communis*) 由来のアオバニン (Goto and Kondo, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30:17, 1991) 及びオヤマリンドウ (*Gentiana Makinoi*) 由来のゲンチオデルフィン (Yoshida et al., Tetrahedron 48:4313, 1992) を始め、

自然界からの数多くの分離例が報告されている（タイムツバナ：Kondo et al., *Tetrahedron* 26:5879, 1985； シソ、パンジー：Goto et al., *Tetrahedron* 27:2413, 1987； シマフムラサキツユクサ：Idaka et al., *Tetrahedron* 28:1901, 1987； ヤマノイモ：Shoyama et al., *Phytochemistry* 29:2999, 1990； アカキヤベツ、キキョウ、ロベリア、ラークスパー、チョウマメ：Goto and Kondo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:17, 1991； ニンジン：Glabgen et al., *Phytochemistry* 31:1593, 1992； アサガオ：Lu et al., *Phytochemistry* 32:659, 1992； キランソウ、トウバナ、オドリコソウ、ラベンダー、イヌハッカ、オオキセワタ、プレクトサンサス、ウツボグサ、ヒゴロモソウ、ネジリイモ：Saito and Harborne, *Phytochemistry* 31:3009, 1992； オオオニバス：Strack et al., *Phytochemistry* 31:989, 1992； カンパニュラ：Brandt et al., 33:209, 1993）。

【0005】

これらのアントシアンを含むフラボノイドを修飾するアシル基は構造的に2種類に分けられる。一つはヒドロキシ桂皮酸を中心とする芳香族アシル基であり、もう一つはマロニル基のような脂肪族アシル基である。これらのアシル基転移反応のうち、グルコースを介して芳香族アシル基、好ましくはクマル酸やコーヒー酸が結合したアントシアンはその吸収極大が長波長側に移動することがアサガオ（*Pharbitis nil*）のアントシアン系色素を用いた実験により観察された（Dangle et al., *Phytochemistry* 34:1119, 1993）。

【0006】

さらに、シネラリア（*Senecio cruentus*）由来のシネラリンは1個の脂肪族アシル基と3個の芳香族アシル基を有するが、シネラリンからの芳香族アシル基の解離により、中性の水溶液中で色素の安定性が低下することが

報告されている (Goto et al. *Tetrahedron* 25:6021, 1984)。また、リンドウ (*Gentiana Makinoi*) に由来するゲンチオデルフィンはその分子内に存在する2つの芳香族アシル基により、サンドイッチ型の分子内スタッキングが起こり、水溶液中で色素が安定化されることが報告されている (Yoshida et al. *Tetrahedron* 48:4313, 1992)。

【0007】

しかしながら、これらの研究は有機化学的側面から天然色素の構造学的研究において為されており、生化学的な側面からの研究は為されていない。植物におけるアントシアン系色素へのアシル基転移酵素のうち、脂肪族アシルであるマロニル基転移酵素についてはパセリの培養細胞 (Matern et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 208:233, 1981; Matern et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 226:206, 1983; Matern et al., *Eur. J. Biochem.* 133:439, 1983) や *Cicer arietinum* の実生 (Koster et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 234:513, 1984) からのものを始めとして多くの報告が為されている。

【0008】

一方、芳香族アシル基転移反応は 1980 年にナデシコ科の植物である *Silene* (Kamsteeg et al., *Biochem. Physiol. Pflanzen* 175:403, 1980) で初めて示され、*Mattiola* の可溶化酵素画分にも同様の芳香族アシル基転移酵素活性が見い出されている (Teusch et al., *Phytochemistry* 26:991, 1986)。

【0009】

しかしながら、これらの報告では酵素活性の存在を示したのみに留まっており、対応する酵素蛋白質を特定したり、その一次構造やさらにはそれをコードする遺伝子についてはなんら知見が得られていない。それ以外の芳香族アシル基転移酵素についても蛋白質や遺伝子の一次構造を明らかにした報告はなく、さらにこ

のアントシアン系色素のアシル化反応を花色幅の拡大に積極的に利用して花を育種した例や、アシル化を用いてアントシアンの安定化をはかった報告もない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

植物においてフラボノイド好ましくはアントシアンへのアシル基転移反応を制御する可能性はそれにより単一種が広範囲の花色を発現する可能性を提供する。特に、芳香族アシル基の転移により、アントシアンの吸収極大が長波長側に移動することから、既存の花色に青味を持たす場合に有効であると考えられる。

【0011】

これらの技術を実現化させるためには芳香族アシル基転移反応をつかさどる酵素を明らかにし、その酵素をコードするcDNAを分離する必要がある。更に、一つのアシル基転移酵素のcDNAから遺伝子の相同性を利用して他のアシル基転移酵素遺伝子の分離が可能となる。また、アシル化によりアントシアンの安定性が増すことから、安定なアントシアン色素の生産も可能となる。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、リンドウの花弁からアシル基転移酵素を精製し、その一次構造を決定した。更には、遺伝子組換え技術を用いてリンドウのアシル基転移酵素のcDNAを単離し、構造遺伝子の塩基配列を決定した。即ち、本発明はリンドウの花弁に存在するアシル基転移酵素をコードしているDNA配列を提供するものである。また、本発明に係る酵素を用いてアントシアン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアンの安定性を増すことができる。

【0013】

アシル基転移酵素をコードする遺伝子は例えば次のようにして得ることが出来る。即ち、まず、リンドウの花弁よりアシル基転移酵素を精製する。従来、本発明が成される以前に、芳香族アシル基転移酵素の精製に成功した例はなく、本発明者らは各種のクロマトグラフィー法、特にブルーセファロース樹脂を用いたアフニティークロマトグラフィー法を行うことにより初めて当該酵素の精製に成功

した。

次に、常法に従ってアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列を解明し、それらのアミノ酸配列に対応する合成ヌクレオチドを作製する。

【0014】

一方、同じリンドウの花弁より poly A+RNA を抽出し、常法により、2本鎖 cDNA を合成し、更に cDNA ライブラリーを作成する。前述の2本鎖 cDNA を鋳型にし、前述の合成DNA と cDNA を合成する際に使用した合成DNA プライマーを用い、PCR 法により、アシル基転移酵素遺伝子に特異的なDNA 断片を取得する。次に、このDNA 断片をプローブにして、前述の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、陽性クローンを得る。そして、このクローンから回収されるプラスミドDNA を分離し、DNA 塩基配列を決定する。更に精製したアシル基転移酵素の分析により得られたアミノ酸配列とDNA 塩基配列から推定したアシル基転移酵素のアミノ酸配列とを比較することにより、陽性クローンが求める cDNA クローンであることを確認する。

【0015】

また、このクローンを大腸菌及び酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、酵素活性を測定することにより、得られた遺伝子がアシル基転移酵素をコードしていることを確認し、アシル基転移酵素遺伝子の翻訳領域を明らかにすることにより本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子が得られ、更に、当該遺伝子を発現させることにより遺伝子産物である目的のアシル基転移酵素蛋白を得ることができる。

【0016】

なお、本明細書においては主にリンドウ由来のアシル基転移酵素について述べているが、当該酵素の精製法をそのまま又は一部を改変して、他の植物のアシル基転移酵素を精製し、当該酵素に係るアミノ酸配列を決定することにより、当該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることができる。更に、本発明に係るリンドウ由来のアシル基転移酵素の cDNA をプローブとして用いれば、他の植物の類似のアシル基転移酵素の cDNA 又は染色体DNA クローンを得ることが可能である。

【0017】

また、本明細書において示したように、リンドウ由来のアシル基転移酵素を精製し、常法に従って当該酵素に対する抗体を得ることにより、その抗体と反応する蛋白質を作る cDNA 又は染色体 DNA をクローニングすることができる。従って、本発明はリンドウ由来のアシル基転移酵素の遺伝子のみに限定されるものではなく、広く芳香族アシル基転移酵素に関するものである。

【0018】

また、本明細書においてはアントシアンを含むフラボノイドのアシル基転移反応において、アシル基の供与体として p-クマロイル-CoA 又はカフェオイル-CoA 等の CoA エステルを挙げたが、p-クマロイル、フェルロイル又はシナポイル-1-O-グルコースといったヒドロキシシンナモイル-1-O-グルコースも芳香族アシル基の供与体としての利用が可能であるので (Glasgen and Seitz, Planta 186:582, 1992)、本発明に係る酵素を用いた利用が可能である。

【0019】

【実施例】

以下に本発明を実施例に基づいて詳細に説明する。実験の手順は特に記述しない限り Sambrook らの Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従った。

実施例 1 植物からのアシル基転移酵素の検索

(1) 基質の調製

デルフィニジン 3、5-ジグルコシドおよびシアニジン 3、5-ジグルコシドはバーベナ (Verbena hybrida) の一品種であるタピアンバイオレット (サントリー (株) 栽培センターにて育種されていたもの) の花卉からそれぞれのジアセチル体を抽出し、脱アセチル化することにより取得した。タピアンバイオレットの花弁 (348 g) を液体窒素とともにホモジナイザーで摩砕し、50% (v/v) アセトニトリル、0.2% トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液 1.5 L に浸して 3 日間放置した。

【0020】

濾紙上にケイソウ土（#100）を敷き詰めて吸引ろ過し、ロータリーエバポレーターで約半分量に濃縮して、HP-20にアプライした。800mlの蒸留水で洗浄後、50%アセトニトリル、0.1%TFA 800mlで色素画分を溶出した。エバポレーターで濃縮後、凍結乾燥して、粗色素（7.3g）を得た。

【0021】

タピアンの主色素はデルフィニジン及びシアニジンの3、5-ジアセチルグルコシドであるため、以下の脱アセチル化操作を行った。粗色素1gをメタノール50mlに溶解し、窒素ガスを15分間通気して溶存酸素を除いた後、氷冷した。

【0022】

一方で、1N水酸化ナトリウム50mlから同様に溶存酸素を除き、氷冷下で先の色素溶液に攪拌しながら滴下し、更に30分間攪拌して加水分解反応をさせた。6N塩酸1mlを加えて反応を停止させ、蒸留水5mlを加えてエバポレーターで約半量に濃縮し、終濃度10%になるようにメタノールを加えて2mlずつSep Pac C18カラム（ウォーターズ アソシエーション社）にアプライし、蒸留水5mlで洗浄した後、30%アセトニトリル、0.6%TFA 2mlで溶出させた。

【0023】

溶出液をすべて集めてエバポレーターで濃縮し、HPLCによる分取を行った。DEVELO SIL ODS-10/20（50×300mm；野村化学（株））カラムを用い、120分間でTFAが0.1%から0.3%、アセトニトリルが10%から30%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.5分毎に分取し、各画分の色素画分の吸収スペクトルを測定して、デルフィニジン3、5-ジグルコシドおよびシアニジン3、5-ジグルコシドを分離してそれぞれを濃縮、凍結乾燥した（デルフィニジン3、5-ジグルコシド 75mg、シアニジン3、5-ジグルコシド 50mg）。各々を1.5mg/mlになるように0.5%TFAに溶解して、使用するまで-80℃に保存した。

【0024】

もう一方の基質であるヒドロキシシンナモイル-CoAの合成は以下の方法で行った。最初に、文献 (Stockigt and Zenk, Z. Naturforsch. 30:352, 1975) に従ってカフェ酸 (ナカライテスク社) とN-ヒドロキシスクシンイミド (メルク (Merck) 社) よりエステルを合成した。このエステル0.5mmolを2mlのアセトンに溶解し、一方でコエンザイムA (CoA: KOHJIN) 0.1mmolと炭酸水素ナトリウム1mmolとを20mlの水に溶解して、これに先のエステル溶液を1滴ずつ加えた。

【0025】

攪拌しながら窒素ガスの下で室温で一晩反応させた後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、遠心 (27000×g、10分) によって不溶物を除いて、HPLCで目的の生成物を分取した。DEVELO SIL ODS-10/20 (50×300mm; 野村化学 (株)) カラムを用い、0.1% TFA存在下でアセトニトリルが40分間で18%から36%の直線濃度勾配によって溶出させた。毎分32mlの流速で0.8分毎に分取し、各画分の吸光スペクトル (200~400nm) を調べて344~348nmに極大吸収を持つ画分をカフェオイルCoA画分として集めた。それらをロータリーエバポレーターで濃縮した後、同じカラムで再び分離した。

【0026】

但し、アセトニトリル18%、TFA 0.1%の等濃度クロマトグラフィーで分離を行い、同様に吸光スペクトルを調べて、目的の化合物を含む画分をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した。この方法で35mmolの生成物が得られた。また、上記の方法中カフェ酸のかわりにクマル酸を用いることによりp-クマロイル-CoAが合成でき2mg/mlになるように蒸留水に溶解して、使用するまで-80℃に保存した。

【0027】

(2) 粗酵素液の抽出方法

酵素を抽出する植物組織 (花卉や食用部分) 3gを液体窒素で凍結させて乳鉢

上で磨砕した。10 mlの抽出用緩衝液（100 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）、10 mMアスコルビン酸ナトリウム、14 mM 2-メルカプトエタノール）を加えて更に磨砕し、ガーゼ3層で濾過した。DOWEX（1-X2、100-200 mesh；室町化学工業（株））3 gを添加して10分間攪拌した後に吸引ろ過によって樹脂を除去し、遠心分離（27000×g、20分）によって植物体残査を除いた。70%飽和硫酸で塩析を行い、タンパク質を沈殿させた。沈殿を1 mlの溶解用緩衝液（20 mMリン酸緩衝液（pH 7.5）、14 mM 2-メルカプトエタノール）に懸濁し、遠心分離（27000×g、5分）によって不溶物を除去した後、溶解用緩衝液で平衡化させたSephadex G-25カラム（NAP-10；ファルマシア社）を用いて脱塩した溶液を粗酵素液として用いた。

【0028】

（3）酵素活性の測定方法

100 mM リン酸緩衝液（pH 8.5）、デルフィニジン3、5-ジグルコシド 24 nmol、カフェオイル-CoA 21.5 nmol、及び酵素液20 mlを含む反応液50 mlを30℃で10分間反応させた。13.8%（v/v）酢酸を含むアセトニトリル50 mlを加えて反応を停止させ、遠心分離（18000×g、5分）によって不溶物を除いた後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。分析はC18逆相カラム（YMC-Pack ODS-A、6.0×150 mm；ワイエムシ社）を用い、21.6%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸を毎分1 mlの流速で流し、反応液20 mlを分析した。化合物の検出には三次元クロマトグラフィーシステム（CLASS-LC10；（株）島津製作所）を使用し、生成物は300 nm付近に極大吸収をもつこと、及び極大吸収が約4 nm長波長側に移動していることからアシル基（カフェ酸）が結合し、デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドが生成していることを確認した。

【0029】

520 nmの波長で検出し、基質（デルフィニジン3、5-ジグルコシド）と生成物（デルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシド）とのピー

ク面積の和に対する生成物のピーク面積の比を求め、生成物のモル数を計算して酵素活性 (k a t) とした。この H P L C 分析における各化合物の展開時間は次の通りである。カフェオイル-C o A : 6. 3 分、デルフィニジン 3、5-ジグルコシド : 3. 3 分、デルフィニジン 3-グルコシル 5-カフェオイルグルコシド : 5. 3 分。

【0030】

但し、この反応条件下においては反応液中のデルフィニジン 3、5-ジグルコシドがアシル基転移酵素により、カフェ酸で修飾されることにより、反応液の色が濃青色から赤紫色に変化するため、簡便な方法として、マイクロタイタープレート中にて反応を行い、色の変化によって酵素活性を調べることができる。

なお、反応後のプレートを室温で長期間 (1 日 ~ 1 週間) 放置すると、アシル化されていないデルフィニジン 3、5-ジグルコシドは無色化するのに対して、酵素の働きによってアシル化されたデルフィニジン 3、5-ジグルコシドでは赤紫色が残ることから、デルフィニジン 3、5-ジグルコシドがアシル化されることによって中性からアルカリ性の水溶液中での安定化が認められた。同様にシアニジン 3、5-ジグルコシドを基質とした場合も反応液の色が赤紫色から濃青色に変化し、色素が安定化することから、簡易的酵素アッセイ方法での酵素活性の検出が可能である。

【0031】

一方、カフェオイル-C o A のかわりに p-クマロイル-C o A を基質とした場合もアシル化による色の変化及びアントシアニンの安定化が認められるが、色調の変化の度合いはカフェオイル-C o A の場合に比べ少ない。

【0032】

(4) アシル基転移酵素の検索

各種の植物 (リンドウ、アイリス、デルフィニウム、ストック、トルコキキョウ、ナデシコ、スイートピー、ラークスパー、パンジー (以上、花卉)、赤キャベツ、赤タマネギ、金時ニンジン、西洋ニンジン、ムラサキイモ (以上、食用部分) 及びナス (果実上皮部分)) から上記の方法によって粗酵素液を抽出し、酵素活性を測定したところ、トルコキキョウ、ナデシコ及び、リンドウに各々 0.

63、0.0012及び21.8 nkat/mg蛋白質のアシル基転移活性が認められた。抽出タンパク質当たりのアシル基転移酵素活性が最も高いリンドウを酵素精製の材料として用いることにした。

なお、タンパク質濃度の定量にはBio-Rad Protein Assay (Bio-Rad社)を用いた。

【0033】

実施例2 アシル基転移酵素の精製

(1) 酵素の精製方法

エゾリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花卉から酵素の精製を行った。以下の実験は記載がない限り、0~4℃で行った。エゾリンドウの花弁3kgを液体窒素存在下でエクセル・オート・ホモジナイザー (DX-3; 日本精機製作所) を用い磨砕した。8Lの抽出用緩衝液 (100mMトリス塩酸 (pH7.0)、10mMアスコルビン酸ナトリウム、10mMp- (アミジノフェニル) フッ化メタンスルフォニル塩酸塩 (p-APMSF; 和光純薬工業 (株))、5mMジチオスレイトール (DTT; ナカライテスク社)) とポリクラールSB-100 (和光純薬工業 (株)) 500gを加えてポリトロンで完全に粉砕した。

【0034】

粉砕液をガーゼ4層で搾ったのち、さらに遠心分離 (11000×g、30分) して細胞残渣を除去した。40%飽和硫酸で塩析を行い、不溶物を除去した後、70%飽和硫酸で再び塩析を行った。沈殿を250mlの溶解用緩衝液 (20mMトリス塩酸 (pH7.0)、10mMp-APMSF、1mMDTT) に懸濁し、遠心分離によって不溶物を除去した後、同緩衝液で平衡化させたSephadex G-25 (95×110mm; ファルマシア社) のカラムを用いて脱塩した。蛋白質を含む画分を集め (860ml)、以下のクロマトグラフィーに供した。

なお、Q-Sepharose Fast Flow、HiTrap Blue及びPhenyl Superoseの各クロマトグラフィーは室温でFPLCシステム (ファルマシア社) を用いて行った。

【0035】

まず、溶解用緩衝液で平衡化させたQ-Sepharose Fast Flow (26×100mm; ファルマシア社) にアプライし、同じ緩衝液で十分に洗淨した後、塩化ナトリウム濃度を60分間で0Mから0.4Mに変化させる直線勾配により溶出させた(8ml/min)。酵素活性のある画分を集めた(130ml) 後、アフィニティクロマトグラフィーを行った。溶解用緩衝液で平衡化させたHiTrap Blue (5ml, 16×25mm; ファルマシア社) を3本直列に繋いだカラムにアプライし、同緩衝液で十分に洗淨した後、1M塩化ナトリウムを含む同緩衝液で溶出させた。活性画分を70%飽和の硫酸で塩析し、蛋白質の沈殿を得た。

【0036】

この沈殿物を1mlの溶解用緩衝液に懸濁して遠心分離によって不溶物を除いた後、溶解用緩衝液で平衡化させたSephacryl S-200 (25×1150mm; ファルマシア社) にアプライした。毎分0.2mlの流速で、約3mlずつ分取し、再び活性画分を集めて(27ml)、1Mになるように硫酸を加えた。十分に攪拌した後、遠心分離(39000×g、10分)により不溶物を除去し、1M硫酸を含む溶解用緩衝液で平衡化させたPhenyl Superose 5/5 (5.0×50mm; ファルマシア社) にアプライした。

【0037】

毎分0.5mlの流速で、十分に洗淨した後、硫酸濃度を60分間で1Mから0Mに直線的に下げることにより蛋白質を流出させた。0.5mlずつ分取した各画分の酵素活性を測定し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(10%アクリルアミドゲル; 第一化学(株))で分析した結果、ほぼ単一の蛋白質として分子量約5万のバンドが認められ、且つこの蛋白量と活性との相関が認められることから、この蛋白質が目的のアシル基転移酵素であると断定した。更に単一標品を得るために活性を持つ画分(12ml)を逆相HPLCにより精製した。

【0038】

カラムはDEVELO SIL 300C4-HG-5 (4.6×250mm; 野村化学(株))を用い、毎分1mlの流速で、トリフルオロ酢酸0.1%存在

下、30分でアセトニトリル濃度を40.5%から56.7%の直線濃度勾配で変化させることにより溶出させた。280nmの吸収をモニターしながら1mlずつ分画し、さらに各画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析して分子量約50000の蛋白質を含む画分を集めた。このHPLC操作を30回繰り返し、スピードバック（サバント社）で濃縮することにより約0.2mgの単一蛋白質標品を得ることができた。

【0039】

(2) 精製蛋白質の分析

500 pmolの精製標品をアミノ酸シーケンサー（PSQ-1；（株）島津製作所）に供したところ、エドマン分解の第一段目で200 pmolのグルタミン酸、更に第2段でも90 pmolのグルタミン酸が検出されたが、三段目以降は判読不能であったため、本酵素のN末端は何らかの形でブロックされていると考えられた。

【0040】

しかしながら、N末端がグルタミン酸である場合にはピログルタミル基が生じ、エドマン分解によるシーケンスでは上述のような結果を示すことが知られていることから本酵素のN末端はグルタミン酸である可能性が高い。

【0041】

残りの沈殿を80mlの45mMトリス塩酸（pH8.5）、3.6M尿素、0.09% SDSを含む溶液に溶解し、リシルエンドペプチダーゼ（Lysyl Endopeptidase: *Achromobacter lyticus* 由来；和光純薬工業（株））16 pmolを加えて、37℃で6時間反応させた。反応液をそのままDEVELO SIL 300C4-HG-5カラムで分離した。

【0042】

分離条件は、0.1%トリフルオロ酢酸のもと、70分でアセトニトリル濃度が0%から80%の直線濃度勾配、毎分0.7mlの流速で、210nmの吸収をモニターしながら吸収のピーク画分のみを分取した。得られた13本のピーク画分のうち、アセトニトリル濃度が32%から40%の時点で溶出されたピーク

画分の3本を、スピードバックによる濃縮後、さらにODSカラム（DEVELO SIL 300 ODS-HG-5；野村化学（株））を用い、先と同じ条件で分離及び精製を行った。

【0043】

各ピーク画分をスピードバックで濃縮・乾固させ、40%アセトニトリル30mlに溶解させ、アミノ酸シーケンサーに供した。その結果6本のペプチドのアミノ酸配列を判読することができた。以下に、各々のペプチドのアミノ酸配列を示す（アミノ末端からカルボキシル末端の方向に示す）。

【0044】

アミノ酸配列（AT73）；

【化1】

Arg-Phe-Leu-Gly-Ile-Thr-Gly-Ser-Pro-Lys

【0045】

アミノ酸配列（AT72）；

【化2】

Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

【0046】

アミノ酸配列（AT741-1）；

【化3】

Gly-Val-Glu-Ile-Gly-Val-Ser-Leu-Pro-Lys

【0047】

アミノ酸配列（AT741-2）；

【化4】

Ala-Ser-Leu-Ser-Leu-Thr-Leu-Lys

【0048】

アミノ酸配列 (AT9) ;

【化5】

His-Tyr-Val-Pro-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Leu-Met-Pro-Ile-Lys

【0049】

アミノ酸配列 (AT83) ;

【化6】

Val-Arg-Ala-Thr-Tyr-Val-Leu-Ser-Leu-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys

【0050】

実施例3 リンドウアシル基転移酵素のcDNAクローニング

(1) cDNAライブラリーの作製

市販されているリンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) から花卉を集め、液体窒素中で乳鉢で磨砕した。この磨砕物から、グアニジンチオシアネート/塩化セシウムを用いる方法によりRNAを得、オリゴテックス (日本ロッシュ) を用い、製造者が推奨する方法にて、poly A+RNAを得た。グアニジンチオシアネート/塩化セシウムを用いる方法は、R. McGookin, Robert J. Slaterらの、*Methods in Molecular Biology* vol 2, (Humana Press Inc. 1984) に詳細に示されている方法に従った。

【0051】

得られたpoly A+RNAを鋳型とし、ストラタジーン (Stratagene) 社のZAP-cDNA合成キットを用いて2本鎖cDNAを合成し、ファージベクターλZAPIIへのクローニングを行った。更に、同社のGigapackII Gold Packaging Extractキットを用いて、当該キットに記載された方法でcDNAライブラリーを作製した。

【0052】

(2) 合成DNAプライマーの設計

実施例2で得られた部分アミノ酸配列のうち、

【0053】

【化7】

Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

で示される配列は、リジルエンドペプチダーゼの特異性を考えると、

【0054】

【化8】

Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala-Lys

であると考えられる。この配列の中の

【0055】

アミノ酸配列；

【化9】

Lys-Ile-His-Met-Asp-Ala-Phe-Ala

で示される部分を用いて、以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0056】

ヌクレオチドの配列（オリゴ1）；

【化10】

5'-AARATMCAHATGGAYGCITTYGC-3'

【0057】

但し、特に記載のないかぎり、核酸の配列はIUPAC-IUB準拠の核酸コード表に従って一文字で表記する。即ち、A：アデニン、C：シトシン、G：グアニン、T：チミン、Y：C又はT、R：A又はG、M：A又はC、H：A又はC又はT、及びIはイノシンを示す。

また、先に述べたcDNAライブラリー作製時に使用したプライマーをもとに以下の他のオリゴヌクレオチドも合成した。

【0058】

ヌクレオチドの配列（オリゴ2）；

【化11】

5'-CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

【0059】

（3）アシル基転移酵素遺伝子断片のクローニング

リンドウの花弁のRNAに由来する2本鎖DNA約0.1mgを鋳型にオリゴ1とオリゴ2をプライマーとして、PCR反応を行った。反応はポリメラーゼチェーン反応キットGene Amp（宝酒造（株））を用いて、95℃1分、45℃1分、72℃2分を1サイクルとし、35サイクル行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約400bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、その10ngをDIG-ヌクレオチド混合液（ベーリンガー社）と合成ヌクレオチドIとIIを用いて、前述のPCR反応を25サイクル行い、DIGで標識したDNA断片を得た。

【0060】

（4）アシル基転移酵素のcDNAのクローニング

上記のようにして得られたλファージライブラリーを大腸菌XL1-Blue株（ストラタジーン社）に感染させ、1プレート当りプラーク5万個を含む5枚のプレート（直径13.5cm）をスクリーニングした。

【0061】

ファージをフィルター（Hybond N+、アマーシャム社）に吸着させ、製造者の推奨する方法で処理した後、このフィルターをハイブリダイゼーションバッファー（5×SSC、50%ホルムアミド、50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH7.0）、7%SDS、2%Blocking reagent（ベーリンガー社）、0.1%ラウロイルサルコシン、80mg/mlサケ精子DNA）中で42℃で1時間保持した。DIG標識した前述のDNA断片をハイブリダイゼーション液中加入え、さらに16時間のインキュベーションを行った。

【0062】

洗浄液（0.2×SSC、0.1%SDS）でフィルターを洗浄し、アルカリホスファターゼで標識されたDIG特異的な抗体による酵素免疫測定法（ベリンガー・マンハイム株式会社）により5-ブromo4-クロロ3-インドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム塩の発色反応によって検出した。検出方法は製造者による使用説明書に従った。

【0063】

この結果、数十個の陽性クローンが得られ、うち20クローンをストラタジーン社の推奨する方法で、cDNAをプラスミドpBluescript SK上に回収した。アガロースゲル電気泳動でcDNAの挿入を調べたところ、全てのクローンにおいて各種サイズのcDNAの挿入が認められ、そのうち最長のものは1.7kbであった。それらのうちから適当に9クローンを選び制限酵素による解析を行ったところ、サイズは異なるが全てのクローンで同様の制限酵素パターンを示した。

【0064】

（5）塩基配列の決定

得られたクローンからプラスミドを抽出し、ABI373A・DNAシーケンサー（パーキンエルマー社）を用い、同社の推奨する蛍光試薬によるダイデオキシシーケンス法で、前述の9クローンのうち全長を含むと考えられる6つのクローン（pGAT2、pGAT3、pGAT4、pGAT7、pGAT8及びpGAT11）についてcDNAの5'側の塩基配列を決定した。

【0065】

その結果、これらのクローンは互いに同じ塩基配列を持っており、cDNAの長さが異なるものと考えられた。これらのクローンのうちpGAT4の全塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、Kilo-Sequence deletionキット（宝酒造（株））を用いて、一連の欠失クローンを得た後、各々のクローン用いて上述の方法により行った。

【0066】

（6）塩基配列とアミノ酸配列の比較

pGAT4に挿入されたcDNAは1703塩基でありその中に1410塩基

(終止コドンを含む) からなるオープンリーディングフレーム (ORF) が見い出された。この配列を配列表 1 に示す。実施例 2 で明らかになったアシル基転移酵素の部分アミノ酸配列の全てが ORF 中のアミノ配列として存在することから、クローニングされた cDNA は、リンドウ由来のアシル基転移酵素遺伝子であると結論した。開始コドンについては、アミノ末端の解析からグルタミン酸がアミノ末端の残基であると推測されたので、cDNA の塩基配列の上で、5' 側から最初の ATG が開始コドンであると推察した。

【0067】

一方、pGAT8 に係る cDNA は、5' 側が pGAT4 よりも 7 塩基短いため、完全長の cDNA ではないと考えられた。

【0068】

実施例 4 大腸菌における遺伝子の発現

(1) 発現プラスミドの構築

大腸菌でのアシル基転移酵素遺伝子の発現には、大腸菌の発現ベクターである pTrc99A (ファルマシア社) を用いた。この pTrc99A はイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) で誘導可能な大腸菌の trc プロモーターを含み、その下流に目的遺伝子を挿入することにより、大腸菌での遺伝子発現が可能になる。

【0069】

また、制限酵素 NcoI 部位が開始コドンである ATG 配列を利用して導入されており、NcoI 部位で組換えることにより、目的遺伝子の開始コドンからの直接発現が可能である。

【0070】

pGAT4 を当該ベクター内に存在する制限酵素部位 EcoRI と KpnI で消化して得られる約 1.8 kb の DNA 断片 (配列表 1 記載の塩基配列を全て含む) を前述の pTrc99A の EcoRI、KpnI 部位に組換えることにより、pGAT101 を構築した。

【0071】

アシル基転移酵素の開始コドン近傍に NcoI 部位の導入を行うために、開始

コドン近傍、及びアシル基転移酵素遺伝子内部（開始コドンから300塩基目付近）に対応する以下の2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0072】

オリゴヌクレオチド（GAT-NcoI）；

【化12】

5'-TTCACCATGGAGCAAATCCAAATGGT-3'

【0073】

オリゴヌクレオチド（GAT-ScaI）；

【化13】

5'-CGAGTCGCCCTCATCAC-3'

【0074】

10ngのpGAT4を鋳型とし、上記のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR反応を行った。反応はポリメラーゼチェーン反応キットGeneAmp（宝酒造（株））を用いて、95℃1分、56℃1分、72℃2分を1サイクルとし、15サイクル行い、得られた反応物を1%アガロース電気泳動したところ、約300bpの特異的なDNA断片が観察された。このDNA断片を回収し、制限酵素NcoIとAatIで切断後、pGAT101をNcoIとAatIで切断して得られる約6kbの断片と連結することにより、pGAT102を構築した。PCR法により増幅した部分の塩基配列はpGAT102構築後にpGAT4と同じであることを確認した。

【0075】

（2）アシル基転移酵素遺伝子の大腸菌での発現

pGAT102で大腸菌MM294（supE44 hsdR endA1 pro thi）（Meselson and Yuan, Nature, 217, 1110-1111, 1968）を形質転換した。なお、ここで形質転換される宿主は、形質転換用の宿主として利用可能な大腸菌であれば特に特定されるものではなく、遺伝子組換えに一般に用いられ、当業者が容易に入手できるその他の株

(例えば、JM109やDH5等)を利用することができる。また、大腸菌の形質転換方法はHanahanの方法に従った(J. Mol. Biol., 166, 557-562, 1983)。形質転換された大腸菌をアンピシリン(50 mg/ml)を含む2 mlのLB培地(トリプトン 10 g、酵母エキス 5 g、塩化ナトリウム 10 gを1リッターの蒸留水に溶かし、水酸化ナトリウムでpHを7.2に調整する)に植菌し、37℃で一晩培養した。

【0076】

この培養液1 mlを10 mlのM9培地(リン酸一水素ナトリウム 0.6%、リン酸二水素カリウム 0.3%、塩化ナトリウム 0.5%、塩化アンモニウム 0.1%、グルコース 0.5%、硫酸マグネシウム 1 mM、ビタミンB1 4 mg/ml、pH 7.2)にカザミノ酸0.5%とアンピシリン50 mg/mlを加えた培地に接種し、37℃で3時間培養後、0.5 MのIPTGを40 μ l添加(終濃度2 mM)し、更に5時間培養を続けた。集菌後、30 mM塩化ナトリウムを含む30 mMトリス塩酸バッファー(pH 7.5)で洗浄し、洗浄菌体を同じバッファー1 mlに懸濁した。1 mg リゾチーム、0.25 M EDTAを25 ml加えて30分間0℃に放置した後、凍結・融解を3回繰り返して菌体を破壊した。

【0077】

これを15000 rpm、30分間遠心をして得た上清を粗酵素液とし、実施例1(3)で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pGAT102を導入した大腸菌ではアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。

【0078】

その結果、pGAT102を導入した大腸菌では24 nmolのデルフィニジン3、5-ジグルコシドと21.5 nmolのカフェオイル-CoAから18.3 nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。

また、大腸菌で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3、5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素

によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

【0079】

実施例5 酵母における遺伝子の発現

(1) 酵母の発現ベクター

酵母の発現ベクター pYGA2269 (Ashikari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989、特開昭62-158481参照) を EcoRI と BglII で消化して得られる約 8 kb の DNA 断片と、M13mp18 (例えば、宝酒造(株)) を EcoRI と BglII で消化して得られる約 0.6 kb の DNA 断片を連結して得られるプラスミドを pYGA22m とした。pYGA22m を SalI で消化したのちに得られる約 8 kb の DNA 断片を自己連結 (セルフライゲーション) してプラスミド pYE22m を構築した。

【0080】

(2) アシル基転移酵素の酵母での発現

pGAT4 又は pGAT8 を当該各ベクター内に存在する制限酵素部位 EcoRI と KpnI で消化して得られる約 1.8 kb の DNA 断片 (配列表1記載の塩基配列を全て含む) と pYE22m を同じく EcoRI と KpnI で消化して得られる約 8 kb の DNA 断片を連結して酵母発現プラスミド pYGAT4 と pYGAT8 を各々構築した。pYGAT4 は第1番目のメチオニンからの翻訳を行うが、pYGAT8 では分離した cDNA の 5' 側の一部が欠けているため、アシル基転移酵素の翻訳開始メチオニン (配列表1におけるアミノ酸配列番号; -1) ではなく、次のメチオニン (配列表1におけるアミノ酸配列番号; 5) からの翻訳が行われる。

【0081】

これらの酵母発現プラスミドでは、アシル基転移酵素をコードしている cDNA は、酵母の構成的なプロモーターのひとつであるグリセロアルデヒド-3リン酸脱水素酵素のプロモーターの下流に連結されており、同プロモーターにより転写が制御されている。

【0082】

伊藤らの方法 (Ito et al. J. Bacteriol., 153, 163-168, 1983) を用い pYGAT4 及び pYGAT8 で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* G1315 (Ashikari et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 515-520, 1989) を形質転換した。形質転換された酵母はトリプトファンの合成能の回復により選択した。

なお、ここで形質転換に用いる酵母の宿主は特に限定されるものではなく、TRP1 遺伝子が不完全なためにトリプトファンの要求性を示す株であれば何れのものでも用いることができる (例えば、イースト・ジェネティック・ストック・センターより購入可能 (Yeast Genetic Stock Center; Berkeley, CA, USA; カタログ第7版 (1991年) 第36頁))。

【0083】

得られた形質転換株を 10 ml の 1% カザミノ酸 (Difco 社) を含むバークホルダー培地 (Burkholder, Amer. J. Bot. 30, 206-210) にて、30℃ で 40 時間振盪培養した。併せて、対照実験のために、トリプトファンの合成能を自然に回復した酵母も同様に培養した。

【0084】

これらを集菌後、同量の菌体破碎用バッファー (30 mM トリス塩酸 pH 7.5, 30 mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、さらに 1 ml の同じバッファーにサスペンドし、1.5 ml のエッペンドルフチューブに移した。遠心分離後、上清を除き 0.4 ml の同じバッファーで沈殿菌体を再度サスペンドし、400 mg のガラスビーズ (Glass Beads 425-600 microns Acid-Wash, シグマ社) を加えて激しく振盪することにより、酵母菌体を破碎した。

【0085】

遠心分離後の上清を粗酵素液とし実施例 1 (3) で示した酵素活性測定法により酵素活性を測定した。マイクロタイタープレート法により、pYGAT4 及び

pYGA T8を導入した酵母は何れもアシル基転移反応が確認されたので、HPLCによる分析を行った。なお、対照に用いた酵母ではアシル基転移活性は認められなかった。

【0086】

その結果、pYGA T4及びpYGA T8を導入した酵母では24 nmolのデルフィニジン3、5-ジグルコシドと21.5 nmolのカフェオイル-CoAから各々16.6 nmolと20.9 nmolのデルフィニジン3-グルコシル5-カフェオイルグルコシドの生成が認められた。pYGA T4とpYGA T8から生産される蛋白質はそのアミノ末端が異なるが、ともにアシル基転移酵素活性を保持していた。

また酵母で生産されたアシル基転移酵素によりアシル化されたデルフィニジン3、5-ジグルコシドも、リンドウから精製して得られたアシル基転移酵素によりアシル化されたものと同様に室温で長期間放置しても安定な発色を示した。

【0087】

【発明の効果】

以上のように、本発明においてはリンドウ由来の芳香族アシル基転移酵素cDNAのクローニングと塩基配列の決定を行った。また、大腸菌と酵母での活性発現を行うことにより、分離したcDNAが芳香族アシル基転移酵素をコードするものであることを確認した。

従って、本発明に係るcDNAを適当な植物発現ベクターに接続し、植物に導入することにより、アシル化反応を植物の花色調節に利用することが可能となった。

また、本酵素活性を利用することにより、植物の中であるいは試験管内でアントシアンの構造を改変し、より安定なアントシアンを提供することができる。

【0088】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ (SEQUENCE LENGTH) : 1407

配列の型 (SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)

鎖の数 (STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)

トポロジー (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)

配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列 (HYPOTHETICAL SEQUENCE) : No

アンチセンス (ANTI-SENSE) : No

起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*)

組織の種類 (TISSUE TYPE) : 花弁 (petal)

直接の起源 (IMMEDIATE SOURCE)

ライブラリー名 (LIBRARY) : cDNA library

クローン名 (CLONE) : pGAT4

配列 (SEQUENCE DESCRIPTION)

TCATT ATG GAG CAA ATC CAA ATG GTG AAG GTT CTT GAA AAA TGC	44
Met Glu Gln Ile Gln Met Val Lys Val Leu Glu Lys Cys	
-1 1 5 10	
CAA GTT ACA CCA CCA TCT GAC ACA ACA GAT GTC GAG TTA TCG CTA	89
Gln Val Thr Pro Pro Ser Asp Thr Thr Asp Val Glu Leu Ser Leu	
15 20 25	
CCG GTA ACA TTC TTC GAT ATC CCC TGG TTG CAC TTG AAT AAG ATG	134
Pro Val Thr Phe Phe Asp Ile Pro Trp Leu His Leu Asn Lys Met	
30 35 40	

CAG TCC CTT CTG TTT TAC GAC TTT CCG TAC CCA AGA ACA CAT TTC	179
Gln Ser Leu Leu Phe Tyr Asp Phe Pro Tyr Pro Arg Thr His Phe	
45 50 55	
TTG GAC ACT GTT ATC CCT AAT CTT AAG GCC TCT TTG TCT CTC ACT	224
Leu Asp Thr Val Ile Pro Asn Leu Lys Ala Ser Leu Ser Leu Thr	
60 65 70	
CTA AAA CAC TAC GTT CCG CTT AGC GGA AAT TTG TTG ATG CCG ATC	269
Leu Lys His Tyr Val Pro Leu Ser Gly Asn Leu Leu Met Pro Ile	
75 80 85	
AAA TCG GGC GAA ATG CCG AAG TTT CAG TAC TCC CGT GAT GAG GGC	314
Lys Ser Gly Glu Met Pro Lys Phe Gln Tyr Ser Arg Asp Glu Gly	
90 95 100	
GAC TCG ATA ACT TTG ATC GTT GCG GAG TCT GAC CAG GAT TTT GAC	359
Asp Ser Ile Thr Leu Ile Val Ala Glu Ser Asp Gln Asp Phe Asp	
105 110 115	
TAC CTT AAA GGT CAT CAA CTG GTA GAT TCC AAT GAT TTG CAT GGC	404
Tyr Leu Lys Gly His Gln Leu Val Asp Ser Asn Asp Leu His Gly	
120 125 130	
CTT TTT TAT GTT ATG CCA CGG GTT ATA AGG ACC ATG CAA GAC TAT	449
Leu Phe Tyr Val Met Pro Arg Val Ile Arg Thr Met Gln Asp Tyr	
135 140 145	
AAA GTG ATC CCG CTC GTA GCC GTG CAA GTA ACC GTT TTT CCT AAC	494
Lys Val Ile Pro Leu Val Ala Val Gln Val Thr Val Phe Pro Asn	
150 155 160	
CGT GGC ATA GCC GTG GCT CTG ACG GCA CAT CAT TCA ATT GCA GAT	539
Arg Gly Ile Ala Val Ala Leu Thr Ala His His Ser Ile Ala Asp	
165 170 175	

GCT AAA AGT TTT GTA ATG TTC ATC AAT GCT TGG GCC TAT ATT AAC	584
Ala Lys Ser Phe Val Met Phe Ile Asn Ala Trp Ala Tyr Ile Asn	
180 185 190	
AAA TTT GGG AAA GAC GCG GAC TTG TTG TCC GCG AAT CTT CTT CCA	629
Lys Phe Gly Lys Asp Ala Asp Leu Leu Ser Ala Asn Leu Leu Pro	
195 200 205	
TCT TTC GAT AGA TCG ATA ATC AAA GAT CTG TAT GGC CTA GAG GAA	674
Ser Phe Asp Arg Ser Ile Ile Lys Asp Leu Tyr Gly Leu Glu Glu	
210 215 220	
ACA TTT TGG AAC GAA ATG CAA GAT GTT CTT GAA ATG TTC TCT AGA	719
Thr Phe Trp Asn Glu Met Gln Asp Val Leu Glu Met Phe Ser Arg	
225 230 235	
TTT GGA AGC AAA CCC CCT CGA TTC AAC AAG GTA CGA GCT ACA TAT	764
Phe Gly Ser Lys Pro Pro Arg Phe Asn Lys Val Arg Ala Thr Tyr	
240 245 250	
GTC CTC TCC CTT GCT GAA ATC CAG AAG CTA AAG AAC AAA GTA CTG	809
Val Leu Ser Leu Ala Glu Ile Gln Lys Leu Lys Asn Lys Val Leu	
255 260 265	
AAT CTC AGA GGA TCC GAA CCG ACA ATA CGT GTA ACG ACG TTC ACA	854
Asn Leu Arg Gly Ser Glu Pro Thr Ile Arg Val Thr Thr Phe Thr	
270 275 280	
ATG ACG TGT GGA TAC GTA TGG ACA TGC ATG GTC AAA TCA AAA GAT	899
Met Thr Cys Gly Tyr Val Trp Thr Cys Met Val Lys Ser Lys Asp	
285 290 295	
GAC GTC GTA TCA GAG GAA TCA TCG AAC GAC GAA AAT GAG CTC GAG	944
Asp Val Val Ser Glu Glu Ser Ser Asn Asp Glu Asn Glu Leu Glu	
300 305 310	

TAC TTC AGT TTT ACA GCG GAT TGC CGA GGA CTT CTG ACG CCC CCG	989
Tyr Phe Ser Phe Thr Ala Asp Cys Arg Gly Leu Leu Thr Pro Pro	
315	320
TGT CCG CCT AAC TAC TTT GGC AAC TGT CTT GCG TCA TGC GTT GCA	1034
Cys Pro Pro Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ala Ser Cys Val Ala	
330	340
AAA GCA ACA CAT AAA GAG TTA GTT GGG GAT AAA GGG CTT CTT GTT	1079
Lys Ala Thr His Lys Glu Leu Val Gly Asp Lys Gly Leu Leu Val	
345	355
GCA GTT GCA GCT ATT GGA GAA GCC ATT GAA AAG AGG TTG CAC AAC	1124
Ala Val Ala Ala Ile Gly Glu Ala Ile Glu Lys Arg Leu His Asn	
360	370
GAA AAA GGC GTT CTT GCA GAT GCA AAA ACT TGG TTA TCG GAA TCT	1169
Glu Lys Gly Val Leu Ala Asp Ala Lys Thr Trp Leu Ser Glu Ser	
375	385
AAT GGA ATC CCT TCA AAA AGA TTT CTC GGG ATT ACC GGA TCG CCT	1214
Asn Gly Ile Pro Ser Lys Arg Phe Leu Gly Ile Thr Gly Ser Pro	
390	400
AAG TTC GAT TCG TAT GGT GTA GAT TTT GGA TGG GGA AAG CCT GCA	1259
Lys Phe Asp Ser Tyr Gly Val Asp Phe Gly Trp Gly Lys Pro Ala	
405	415
AAA TTT GAC ATT ACC TCT GTT GAT TAT GCA GAA TTG ATT TAT GTG	1304
Lys Phe Asp Ile Thr Ser Val Asp Tyr Ala Glu Leu Ile Tyr Val	
420	430
ATT CAG TCC AGG GAT TTT GAA AAA GGT GTG GAG ATT GGA GTA TCA	1349
Ile Gln Ser Arg Asp Phe Glu Lys Gly Val Glu Ile Gly Val Ser	
435	445

TTG CCT AAG ATT CAT ATG GAT GCA TTT GCA AAA ATC TTT GAA GAA	1394
Leu Pro Lys Ile His Met Asp Ala Phe Ala Lys Ile Phe Glu Glu	
450 455 460	
GGC TTT TGC TCT TTG TCA TAGTCTCTTT AATAGAACCA TATTTGCTGC	1442
Gly Phe Cys Ser Leu Ser	
465	
AATAAAGTAC CAAGTCCTTT AGTAACACTA CACCAAACCC TACTTTCGAG GCGGGAACAC	1502
CACAACGAGG TTCAATCACT AGAAGGTTGT ACTTCATAAA TTCCAGAGGT CGAATATACA	1562
CCGTTGTCCT CTGAAAAGTT GAACCTCACA CCTGACATGG TGTACGATA GGTATTGTAT	1622
AATGCCATTA TATACTTCCA TAAAGTATCC TATGCAATAG AGAACATGTT ATGTGTAA	1682
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA A	1703

【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 芳香族アシル基転移酵素をコードする遺伝子及びその利用を提供する

【構成】 リンドウ (*Gentiana triflora* var. *japonica*) の花卉からアシル基転移酵素を精製してそのアミノ酸配列の一次構造を決定し、当該アミノ酸配列の情報に基づき、遺伝子組換え技術を用いてリンドウ由来のアシル基転移酵素に係る cDNA を単離した後、構造遺伝子の塩基配列を決定することにより目的のアシル基転移酵素をコードする遺伝子を得た。

【効果】 本発明に係るアシル基転移酵素をコードする遺伝子を用いてアントシアニン系色素をアシル化することにより花色を変化させることができ、アントシアニンの安定性を増すことができる。

【選択図】 なし

特平 7-067159

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001904

【住所又は居所】

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

【氏名又は名称】

サントリー株式会社

特平 7-067159

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名	サントリー株式会社